



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 101 13 776.1

Anmeldetag: 21. März 2001

Anmelder/Inhaber: Institut für Bioanalytik GmbH Göttingen,
Göttingen/DE

Bezeichnung: Sequenziell angeordnete streptavidinbindende
Module als Affinitätsanhängsel

IPC: C 07 K, C 07 H, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 8. März 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft sequenziell angeordnete
s streptavidinbindende Bindungsmodule, die insbesondere als
Affinitätsanhängsel eingesetzt werden können. Die Affinitätsanhängsel
umfassen mindestens zwei Einzelmodule, die eine avide Bindung an
Streptavidin vermitteln können.

10

15

pu/ANM/24775PDE-21.03.2001

Sequenziell angeordnete streptavidinbindende Module als Affinitätsanhängsel

5

Beschreibung

10

Die vorliegende Erfindung betrifft sequenziell angeordnete streptavidinbindende Peptid-Bindungsmodule, die insbesondere als Affinitätsanhängsel eingesetzt werden können. Die Affinitätsanhängsel umfassen mindestens zwei Einzelmodule, die eine averse Bindung an Streptavidin vermitteln können.

15

20

Viele Projekte zur Aufklärung von Genomen von verschiedenen Organismen stehen kurz vor der Fertigstellung. So wurde das menschliche Genom kürzlich fast vollständig sequenziert und die Sequenzdaten zugeordnet und aufgearbeitet (erschieden in i) Nature, Vol. 409, 15. Februar 2001, ii) Science, Vol. 291, Nr. 5507, 16. Februar 2001). Eine der nächsten Herausforderungen wird die Aufklärung der jeweils zugehörigen Proteome sein, d.h. die Aufklärung der dem Genom zugehörigen Proteinfunktionen und ihr dynamisches Wechselspiel zum Aufbau von zellulären Funktionen.

25

30

Mit Hilfe moderner gentechnischer Methoden ist es möglich, fast jedes natürliche Gen zu klonieren und das zugehörige Protein rekombinant in Mikroorganismen oder Gewebekulturen zu produzieren. Damit wird zum einen der Zugang zu Proteinen geschaffen, die in ihrem natürlichen Produzenten nur in verschwindend geringen Mengen vorkommen und daher aus dieser Quelle nicht oder nur schwer zu gewinnen sind. Zum anderen schafft der rekombinante Ansatz aber auch eine große Vielfalt an gentechnischen Möglichkeiten, das Zielprotein zu verändern, um es dadurch genau zu charakterisieren und/oder um es dadurch leichter handhaben zu können.

Ein erster Schritt zur Charakterisierung des Zielproteins ist in der Regel dessen Reinigung von den Wirtsproteinen, die klassisch nur durch die empirische Entwicklung eines für jedes Protein speziellen Verfahrens erreicht werden kann. Um ein Detektionsverfahren zu etablieren, das z.B. wichtig für die Optimierung von Herstellungsprozessen, aber auch „downstream“ für die weitere Charakterisierung des Zielproteins hilfreich sein kann, war es früher notwendig, ein spezifisches Antiserum gegen das gewünschte Protein herzustellen, wozu aber wiederum das Zielprotein zunächst als Reinsubstanz dargestellt werden mußte. Weitere Verfahren zur „downstream“-Analyse von rekombinanten Proteinen bedingen oft die möglichst irreversible Immobilisierung an einer festen Phase wie z.B. in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte oder in Form von sogenannten „Arrays“ auf Chips (Proteinchips). Da jedes Protein eine Substanz mit individuellen Eigenschaften ist und deswegen jedes Protein bei der direkten Immobilisierung anders beeinflusst wird, ist es zur Präsentation von Proteinen in nativer, authentischer Form von Vorteil, wenn die Immobilisierung durch ein unabhängiges Modul auf standardisierte Weise erreicht werden kann.

Eine universelle Lösung für diese Fragestellungen beruht prinzipiell auf der geringfügigen Modifikation eines rekombinanten Gens während der Klonierung mit Nukleotidsequenzen, die für sogenannte Peptidanhängsel (Peptid-Tags) codieren. Dabei ist es wichtig, dass das Peptidanhängsel geeignete Bindungseigenschaften für einen Rezeptor hat. In der Praxis sieht die Ausnutzung eines solchen Peptidanhängsels folgendermaßen aus:

Nach oder während der Expression wird das beliebige Zielprotein durch ein Peptidanhängsel modifiziert. Die bekannten und gut charakterisierten Bindungseigenschaften des Peptidanhängsels in verschiedenen Testverfahren für seinen Rezeptor stehen jetzt für die weitere Analyse des Zielproteins zur Verfügung. In der Regel wird das Affinitätsanhängsel zunächst zur Reinigung des fusionierten Proteins mittels eines

immobilisierten Rezeptors genutzt. Für die Reinigung durch Affinitätschromatographie ist es wichtig, dass das rekombinante Fusionsprotein unter milden Bedingungen wieder von der festen Phase eluiert werden kann. Nach der Reinigung ist es unter Umständen
5 wünschenswert, dass das Peptidanhängsel zur Immobilisierung des rekombinanten Zielproteins an einer festen Phase wie z.B. an der Wand einer Mikrotiterplattenvertiefung ausgenutzt werden kann. Hier ist in der Regel die besonders feste Anbindung gewünscht, d.h., dass sich das Fusionsprotein unter keinen Umständen wieder von der festen Phase
10 während des Testverfahrens ablöst.

Ein häufig verwendetes Peptidanhängsel ist der His₆-Tag. Dieser bindet an Schwermetallionen, wie etwa Nickel unter Bildung eines Chelats. Ein Problem, das bei der Verwendung dieses Tags bei der Reinigung von
15 Proteinen auftritt, ist die Kontamination des gewünschten Proteins mit den als Rezeptor verwendeten Schwermetallen. Weiterhin handelt es sich bei der Chelatbildung zwischen Schwermetall-Rezeptor und His₆-Tag um eine Bindung mit nur geringer Spezifität. Zur Loslösung des Tags sind hohe Konzentrationen an Imidazol erforderlich, welche in vielen Anwendungen
20 ebenfalls problematisch sein können. Insgesamt können unter Verwendung von His₆-Tags bisher Reinheitsgrade von etwa 80 % des gewünschten Proteins erhalten werden.

Eine weitere Klasse von Peptidanhängseln mit einer spezifischen
25 Bindungseigenschaft für Streptavidin als Rezeptor wurden z.B. im US-Patent 5,506,121 offenbart. Diese Peptidanhängsel wurden Strep-tag genannt und werden weltweit unter diesem Namen vertrieben.

Die Entwicklung dieser Affinitätsanhängsel hatte ihren Ursprung in der
30 Beobachtung von Devlin et al. (1990) und Lam et al. (1991), dass Streptavidin überhaupt in der Lage ist, Peptide zu binden. Als Mindestmotiv für Streptavidinbindung wurde von den Autoren die aus 3 Aminosäuren

bestehende Peptidsequenz $\text{NH}_2\text{-His-Pro-Gln(Met, Asn)-COOH}$ erachtet. Solche Peptide alleine konnten jedoch nicht für praktische Anwendungen herangezogen werden, da die Bindungsaffinität zu gering war (Weber et al., 1992). Erst nachdem Schmidt und Skerra (1993) die Affinität optimierten, wurden praktische Anwendungen möglich (siehe auch US-Patent 5,506,121).

Trotz der Optimierung von Schmidt und Skerra (1993) gab es immer noch Probleme in bestimmten Anwendungsformaten und/oder wegen des unterschiedlichen Einflusses von verschiedenen Fusionsproteinen auf die Bindungsaffinität zu Streptavidin (Schmidt und Skerra, 1994). Insbesondere zeigte sich, dass das zunächst am stärksten bevorzugte streptavidinbindende Peptid mit der Sequenz $\text{NH}_2\text{-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly-COOH}$ (Strep-tag) nur am freien C-terminalen Ende des rekombinanten Protein-Fusionspartners eingesetzt werden konnte, da die C-terminale Carboxylat-Gruppe eine ionische Wechselwirkung zu einem Argininrest des Streptavidins einging (Schmidt et al., 1996). Für die allgemeinere Anwendung erwies sich die Peptidsequenz $\text{NH}_2\text{-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-COOH}$ (Strep-tag II) als geeigneter, da diese unabhängig von der Platzierung am rekombinanten Fusionsproteinpartner genutzt werden konnte. Allerdings war die Affinität des Strep-tag II:Streptavidin-Komplexes niedriger als die Affinität des Strep-tag:Streptavidin-Komplexes (Schmidt et al., 1996).

Deshalb wurde der Rezeptor Streptavidin hinsichtlich besserer Strep-tag II-Bindung optimiert. Streptavidinmuteine mit deutlich höherer Strep-tag II-Affinität konnten generiert werden und sind im US-Patent 6,103,493 und von Voß und Skerra (1997) offenbart worden. Diese Streptavidinmuteine werden unter dem Namen Strep-Tactin kommerziell vertrieben. Die Affinitätsanhängsel-Technologie auf der Basis der Strep-tag II:Strep-Tactin-Interaktion ($K_d = \text{ca. } 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, Voß und Skerra, 1997) ist für viele praktische Anwendungen gegenüber der Affinitätsanhängsel-Technologie

Scg



Scg

auf der Basis der Strep-tag:Streptavidin-Interaktion ($K_d = \text{ca. } 3,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, Schmidt et al., 1996) deutlich verbessert. Trotzdem gibt es immer noch Limitationen wenn eine besonders feste Immobilisierung erwünscht ist. Dies ist z. B. der Fall bei der Immobilisierung von rekombinanten Strep-tag
5 II-Fusionsproteinen an mit Strep-Tactin beschichteten Mikrotiterplatten oder auf sogenannten Proteinchips, auf denen dann das so standardisiert immobilisierte rekombinante Protein in den komplexesten Testverfahren analysiert werden soll oder wenn das rekombinante Fusionsprotein, das im extremen Problemfall nur sehr verdünnt vorliegt und stark mit anderen
10 Wirtsproteinen verunreinigt ist, insbesondere im „Batchformat“ effizient gereinigt werden soll.

Die unterschiedlichen Anforderungen, die an eine solche Peptidanhängsel Rezeptor-Interaktion gestellt werden, d.h. eine möglichst reversible Bindung
15 zur schonenden Reinigung sowie eine möglichst irreversible Bindung zur Immobilisierung in diagnostischen Testsystemen im Mikrotiterplattenformat oder auf Proteinchips können somit nicht oder nicht optimal durch ein und dieselbe Interaktion erfüllt werden.

20 Versucht man also das Problem durch Generierung einer allgemein optimal funktionierenden Peptidanhängsel:Rezeptor-Interaktion auf monovalenter Basis zu lösen, gerät man in ein Dilemma: Wird die Bindung stark genug für die feste Bindung an Oberflächen, dann kann unter Umständen keine effiziente Elution unter kompetitiven Bedingungen während der
25 affinitätschromatographischen Reinigung durchgeführt werden. Die kompetitive Elution ist aber eine elementare Bedingung, dass die Elution der Affinitätschromatographie spezifisch, effizient und schonend durchgeführt werden kann (siehe z.B. Skerra und Schmidt, 1999). Der Grund des Dilemmas liegt darin dass jede Wechselwirkung durch eine Bindungsrate
30 und eine Dissoziationsrate kinetisch determiniert ist. Es ist ein allgemeines Prinzip, dass für die Immobilisierung an Oberflächen sehr langsame Dissoziationsraten bevorzugt werden, während bei der

affinitätschromatographischen Elution durch ein kompetitiv (kompetitiv bedeutet, dass beide Liganden isoliert, jedoch nicht gleichzeitig binden können) bindendes Agens vergleichsweise schnelle Dissoziationsraten bevorzugt werden. Das heisst also, ein ideales Affinitätsanhangsel müsste sich unter kompetitiven Bedingungen so verhalten, als hätte es eine schnelle Dissoziationsrate zum Rezeptor, und unter nicht kompetitiven Bindungen sollte es eine sehr langsame Dissoziationsrate aufweisen.

Eine Aufgabe der Erfindung war es deshalb, kurze Peptidsequenzen zu entwickeln, die mit einem rekombinanten Protein verbunden werden können, ohne mit dessen Funktion zu interferieren, die den Nachweis mit einem leicht verfügbaren Reagenz ermöglichen, die leicht kontrollierbare Bindungseigenschaften zeigen und welche trotz starker Bindeaffinität an Oberflächen unter kompetitiven Bedingungen leicht eluiert werden können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Peptid, umfassend mindestens zwei streptavidinbindende Einzelmodule oder Epitope, wobei der Abstand zwischen den zwei Einzelmodulen mindestens 0 und maximal 50 Aminosäuren beträgt und wobei jedes Einzelmodul mindestens die Sequenz His-Pro-Baa- beinhaltet, worin Baa entweder Glutamin, Asparagin oder Methionin darstellt.

Eine erfindungsgemäße Lösung besteht somit in der Verwendung von streptavidinbindenden Dianhängseln (Ditags) oder Multianhängseln (Multitags). Damit ist die sequenzielle Anordnung von mindestens zwei unterschiedlichen oder identischen, streptavidinbindenden oder/und streptavidinmuteinebindenden Modulen (Epitopen) gemeint, welche als Fusionspartner zu dem rekombinanten Zielprotein eingesetzt werden können. Überraschenderweise kann durch eine solche Anordnung ein Aviditätseffekt durch divalente oder multivalente Bindung eines Ditags oder Multitags an ein homotetrameres Strep-Tactin- oder Streptavidin- oder anderes Muteinmolekül von Streptavidin erzielt werden. Solche

Aviditätseffekte sind bisher in erster Linie für Immunglobuline bekannt, da diese sich durch ihre flexible „hinge“-Region an die sterischen Anforderungen des bivalenten Bindens an zwei Epitope gleichzeitig anpassen können. Die Struktur des tetrameren Streptavidins (Weber et al., 1989) ist demgegenüber im Vergleich zu Antikörpern eher starr und kaum flexibel.

Die erfindungsgemäßen Ditags oder Multitags sind insbesondere zur kooperativen Bindung an jeweils ein einziges Streptavidintetramer oder Streptavidindimer fähig. Durch die kooperative Bindung wird ein Aviditätseffekt erzielt, also eine verstärkte Bindung der Peptidanhängsel an einen Streptavidin-Rezeptor. Es wird vermutet, dass bei Inkontaktbringen der erfindungsgemäßen Peptide, welche mindestens 2 streptavidinbindende Einzelmodule oder Epitope umfassen, mit einem Streptavidin-Rezeptor zunächst in üblicher Weise eine Wechselwirkung zwischen den Einzelepitopen und den Streptavidin-Rezeptor-Bindestellen erfolgt. Die Ausbildung der Einzelbindung unterliegt dabei jeweils dem Masse-Wirkungs-Gesetz, wobei die Stärke der Bindung durch die jeweiligen Dissoziationskonstanten (K_d) bestimmt wird. Bei Lösung einer Bindung zwischen einem Einzelmodul und einem Streptavidin-Rezeptor erfolgt jedoch keine Loslösung des Peptids vom Streptavidin-Rezeptor, da das Peptid immer noch durch wenigstens ein weiteres Einzelmodul an den Streptavidin-Rezeptor gebunden ist. Aufgrund der räumlichen Nähe zum Streptavidin-Rezeptor, in der sich das losgelöste Einzelmodul befindet, erfolgt dann eine Rückbindung des losgelösten Einzelmoduls an den Streptavidin-Rezeptor. Unter nicht kompetitiven Bedingungen ist somit ein synergistischer bzw. avider Effekt zu beobachten, da immer wieder eine Rückbindung erfolgt.

Unter kompetitiven Bedingungen wird eine frei gewordene Streptavidin-Bindestelle durch einen zumeist im Überschuss zugegebenen anderen

Liganden bzw. Kompetitor belegt, so dass aufgrund von Verdrängungseffekten keine Rückbindung erfolgen kann. Dadurch kann die Aufgabe gelöst werden, 2 verschiedene Bindeaffinitätsstärken bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen bereitzustellen (wobei sich die
5 avide Bindungsstärke unter nicht kompetitiven Bedingungen stärker von den monovalenten Bindungsstärken unterscheidet als unter kompetitiven Bedingungen).

Die erfindungsgemäßen Peptide umfassen bevorzugt 2, 3 oder 4
10 Streptavidin-bindende Einzelmodule, besonders bevorzugt 2 oder 4 Streptavidin-bindende Einzelmodule und am meisten bevorzugt 2 Streptavidin-bindende Einzelmodule.

Ein wesentliches Merkmal der erfindungsgemäßen Peptide besteht darin,
15 dass es sich nicht um 2 separate Anhängsel oder Tags handelt, sondern um eine sequenzielle Anordnung von mindestens 2 Streptavidin-bindenden Einzelmodulen. Auf diese Weise werden die Bindeeigenschaften durch das Streptavidin-bindende Dianhängsel bzw. Multianhängsel festgelegt und sind unabhängig von einem damit zu fusionierenden Protein. Im Gegensatz dazu
20 sind bei Verwendung von 2 unabhängigen Tags am C-Terminus und am N-Terminus eines Proteins oder an gleichen oder verschiedenen Termini von dimeren oder multimeren Proteinkomplexen die Bindeeigenschaften von dem oder den jeweiligen Fusionsprotein (den Domänen), insbesondere von dessen Proteinfaltung abhängig.

25 Mit den erfindungsgemäßen Peptid-Tags lässt sich i) durch die sequenzielle Anordnung von mindestens zwei streptavidinbindenden Peptiden eine wesentlich stärkere Anbindung an immobilisiertes Streptavidin oder Streptavidinmunteine generieren, sodass das Affinitätspeptid ii) den
30 gängigen Standards für diagnostische immunologische Testverfahren im Mikrotiterplattenformat genügt und das gleiche Fusionsprotein mit dem gleichen Ditag lässt sich iii) noch effizient im affinitätschromatographischen

Reinigungsverfahren kompetitiv eluieren. Anders ausgedrückt: Das Ditag verhält sich im Hinblick auf seine Bindungseigenschaften, insbesondere Bindungsfestigkeit in den unter i) und ii) beschriebenen Verfahren wie ein Monotag mit wesentlich höherer Bindungsaffinität und in dem unter iii) beschriebenen Verfahren ähnlich wie die einzelnen Monotags, aus dem das Ditag zusammengesetzt ist, separat betrachtet.

Desweiteren ist das Ditag:Streptavidin-System besonders interessant, da es eine ganze Reihe von streptavidinbindenden Bindungspeptiden aber auch von Streptavidinmuteinen gibt und da dadurch - durch die Ausnutzung aller möglichen Kombinationen - eine besonders große und dennoch fein unterteilte Bandbreite an Bindungsaktivitäten erzeugt werden kann. Verwendet man z.B. die Sequenz $\text{NH}_2\text{-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-COOH}$ bindet das Fusionsprotein besonders stark an Strep-Tactin, in jedem Fall stärker als $\text{NH}_2\text{-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-His-Pro-Gln-Xaa-Xaa-Xaa-COOH}$, welches wiederum stärker als $\text{NH}_2\text{-His-Pro-Gln-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-His-Pro-Gln-COOH}$ bindet. Die gleichen Peptide binden wiederum schlechter an Streptavidin. Durch diese Kombinationsmöglichkeiten kann für jede beabsichtigte Anwendung die Kombination ausgesucht werden, die eine Affinität zu Streptavidin oder Strep-Tactin oder anderem Streptavidinmucin herstellt, die für den beabsichtigten Einsatzzweck ideal ist.

Der Ausdruck "Streptavidin", wie hierin verwendet, umfasst Wildtyp-Streptavidin, Streptavidinmuteine und Streptavidin-artige Polypeptide, soweit nicht im Einzelfall anders angegeben. Unter Wildtyp-Streptavidin (wt-Streptavidin) wird auf die bei Argarana et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986) 1871-1882 offenbarte Aminosäuresequenz Bezug genommen. Streptavidinmuteine sind Polypeptide, welche sich von der Sequenz des Wildtyp-Streptavidins durch eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen,



Seit 3

Seit 4

Seit 5

14



-deletionen oder -additionen auszeichnen, wobei sie die Bindungseigenschaften von wt-Streptavidin beibehalten haben. Streptavidin-artige Polypeptide sowie Streptavidinmuteine sind Polypeptide, welche im Wesentlichen immunologisch äquivalent zu Wildtyp-Streptavidin sind und insbesondere in der Lage sind, Biotin, Biotinderivate oder Biotinanaloga mit gleicher oder unterschiedlicher Affinität wie wt-Streptavidin zu binden. Streptavidin-artige Polypeptide oder Streptavidinmuteine können Aminosäuren enthalten, die nicht Teil des Wildtyp-Streptavidins sind oder sie können lediglich einen Teil des Wildtyp-Streptavidins umfassen. Streptavidin-artige Polypeptide sind auch Polypeptide die zu Wildtyp-Streptavidin nicht identisch sind, da der Wirt nicht über erforderliche Enzyme verfügt, die erforderlich sind, um das Wirt-hergestellte Polypeptid in die Struktur von Wildtyp-Streptavidin zu transformieren.

Unter den Begriff Streptavidin fallen auch Streptavidintetramere sowie Streptavidindimere, insbesondere Streptavidinhomotetramere, Streptavidinhomodimere, Streptavidinheterotetramere und Streptavidinheterodimere. Jede Untereinheit hat in der Regel eine Bindungsstelle für Biotin oder Biotinanaloga oder für streptavidinnbindende Peptide.

Beispiele für Streptavidine bzw. Streptavidinmuteine sind beispielsweise in WO 86/02077, DE 19641876 A1, US 6,022,951, WO 98/40396 und WO 96/24606 angegeben.

Ein weiterer für ein Ditag zu bevorzugender Anwendungsfall ist die besonders effiziente Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen aus verdünnten Lösungen im „Batchformat“ (im Gegensatz zum Säulenchromatographieformat). Wegen der signifikant erhöhten apparenten Affinität im Vergleich zum Monotag reichert sich das Protein in der verdünnten Lösung stärker an der immobilen Phase an und es geht bei den

sequentiellen Waschschritten, während derer sich das Gleichgewicht ja immer wieder neu einstellt, wesentlich weniger rekombinantes Fusionsprotein verloren. Sobald dann das kompetitiv bindende Agens im Überschuss zugesetzt wird, kann das Ditag tragende rekombinante Protein auch im „Batchformat“ effizient eluiert werden.

Unter Batchformat sind insbesondere solche Testformate zu verstehen, bei denen keine Durchwanderung von Elutionsmittel durch eine Säule oder ein Bett stattfindet, sondern Rezeptoren auf einer Festphase fixiert sind und bei jedem Waschschrift praktisch die gesamte flüssige Phase entfernt wird. Beispiele für ein Batchformat sind magnetische Beads, welche an ihrer Oberfläche Rezeptoren tragen und bei einem Waschschrift jeweils mit Flüssigkeit in Kontakt gebracht werden, wobei diese Flüssigkeit dann in jedem Waschschrift wieder vollständig oder nahezu vollständig abgetrennt werden kann. Ein weiteres Beispiel für Batchformat sind Protein-Chips bzw. auf Mikrotiterplatten oder ähnlichen Platten aufgebrachte Rezeptoren.

Erfindungsgemäß umfasst ein Minimalbindungsditag ein isoliertes Peptid, das aus mindestens 2 Einzelmodulen (Epitopen) zusammengesetzt ist, wobei der Abstand zwischen beiden Modulen mindestens 0 und maximal 50 Aminosäuren beträgt und wobei jedes Einzelmodul mindestens die Sequenz -His-Pro-Baa- beinhaltet, wobei Baa entweder Glutamin oder Asparagin oder Methionin repräsentiert.

Mit solchen „Ditags“ oder „Multitags“ können höhere Affinitäten zu dem jeweiligen Streptavidin oder Streptavidinmucin als mit einem einzelnen (z.B. dem besser bindenden, falls zwei verschiedene benutzt wurden) „Monotag“ erzielt werden, auch wenn das besser bindende Modul der zwei Einzelmodule als Monotag eingesetzt wird. Zusätzlich besteht noch die Möglichkeit, eine feinere Abstufung in dem Affinitätsbereich zu erzeugen als dies durch Monotags möglich ist. Trotzdem lassen sich Ditag oder Multitag tragende rekombinante Fusionsproteine effizient kompetitiv von

mit einem Rezeptor beschichteten festen Phasen eluieren. Eine hohe Flexibilität bei der Abstufung des Affinitätsbereichs der erfindungsgemäßen Tags lässt sich auf einfache Weise erreichen und kann insbesondere durch die Wahl des Peptid-Tag (das durch eine Reihe von verschiedenen oder/und identischen Einzelmodulen zusammengesetzt werden kann), durch die Wahl des Rezeptor-Streptavidin und durch die Wahl des Kompetitors zur Elution unter kompetitiven Bedingungen erhalten werden.

Desweiteren ist die Herstellung von stabilen dimeren rekombinanten Proteinen in der folgenden Anordnung möglich: Rekombinantes Protein-Ditag-Streptavidin(mutein) mit insgesamt vier Bindungsstellen-Ditag-rekombinantes Protein. Auch können zwei verschiedene rekombinante Proteine über eine solche Anordnung stabil verbunden werden.

Eine bevorzugte Anwendung von Ditag-Fusionsproteinen ist a) die stabile Anbindung des Fusionspartners an mit Streptavidin(mutein) beschichteten Oberflächen und/oder b) die effiziente Reinigung von Ditag-Fusionsproteinen aus verdünnten Lösungen, insbesondere im Batchformat (im Gegensatz zum Säulenchromatographieformat). Gerade die hochparallele Reinigung im kleinen Massstab, jedoch mit hohen Ausbeuten und hohen Reinheitsgraden und aus komplexen Gemischen ist eine große Herausforderung für Affinitätsanhängelsysteme in „high throughput“-Formaten, die durch den Ditag-Ansatz für streptavidinbindende Affinitätsanhängsel gelöst wurde.

In dem erfindungsgemäßen Peptid liegen die beiden Module, die eine Bindung an Streptavidin vermitteln, in einem Abstand von mindestens 0 und maximal 50, bevorzugt in einem Abstand von mindestens 4, mehr bevorzugt mindestens 8 und bis zu bevorzugt höchstens 30, mehr bevorzugt höchstens 20 Aminosäuren vor. Besonders bevorzugt beträgt der Abstand zwischen den beiden eine Bindung an Streptavidin vermittelnden Einzelmodulen 8 oder 12 Aminosäuren. Die Länge der

Bindungsmodule beträgt bevorzugt mindestens 3, mehr bevorzugt mindestens 4 und am meisten bevorzugt mindestens 6 und bevorzugt höchstens 15, mehr bevorzugt höchstens 12 und am meisten bevorzugt höchstens 8 Aminosäuren.

5

Die zwischen den Einzelmodulen vorliegenden Aminosäuren können beliebige Aminosäuren sein. Es handelt sich bevorzugt um natürlich vorkommende Aminosäuren, es können jedoch auch chemisch modifizierte Aminosäuren vorliegen. Solche chemisch modifizierten Aminosäuren können insbesondere bei einem in vitro Expressionssystem eingebaut werden.

10

In dem erfindungsgemäßen Peptid liegen die streptavidinbindenden Einzelmodule sequenziell vor, d.h. es ist kein Protein mit einer biologischen Funktion zwischen den Einzelmodulen angeordnet, sondern gegebenenfalls lediglich eine gewisse Anzahl an Linker-Aminosäuren. Bevorzugte Linker-Aminosäuren sind Gly und Ser, insbesondere Ketten, welche ausschließlich oder hauptsächlich, z.B. > 60 %, Gly und Ser enthalten. Die Linkerlänge kann an die Entfernung der Bindungszentren in den jeweiligen Streptavidin-Rezeptor angepasst werden. Bei einem tetrameren Streptavidin liegen beispielsweise zwei Bindungsstellen auf der Vorderseite und zwei Bindungsstellen auf der Rückseite vor. Bevorzugt sind deshalb Peptidanhängsel, welche 2 oder 4 (2 + 2) Bindungsstellen aufweisen und dazwischen Linker, welche gerade zur Überbrückung der Entfernung der Bindungszentren geeignet sind. Besonders bevorzugt sind deshalb Peptide mit folgendem Aufbau:

15

20

25

Gegebenenfalls keine oder 1 bis 50 Linker-Aminosäure(n)/Bindemodul mit 3 bis 15 Aminosäuren, insbesondere 3 bis 8 Aminosäuren/Linkerbereich mit 0 bis 20, insbesondere 8 bis 12 Linker-Aminosäuren/Bindemodul mit 3 bis 15, insbesondere 3 bis 8 Aminosäuren/ggf. ein weiterer nichtfunktioneller Peptidbereich mit keiner oder 1 bis 50 Linker-Aminosäure(n) oder gegebenenfalls keine oder 1 bis 50 Linker-Aminosäuren/Bindemodul mit 3

30

- bis 15 Aminosäuren, insbesondere 3 bis 8 Aminosäuren/Linkerbereich mit 0 bis 20, insbesondere 8 bis 12 Linker-Aminosäuren/Bindemodul mit 3 bis 15, insbesondere 3 bis 8 Aminosäuren/Linkerbereich mit 15 bis 40, insbesondere 18 bis 25 Linker-Aminosäuren/Bindemodul mit 3 bis 15, bevorzugt 3 bis 8 Aminosäuren/Linkerabschnitt mit 0 bis 20, insbesondere 8 bis 12 Linker-Aminosäuren/Bindemodul mit 3 bis 15, insbesondere 3 bis 8 Aminosäuren/ggf. Linkerabschnitt mit keiner oder 1 bis 50 Linker-Aminosäure(n).
- 10 Das erfindungsgemäße Peptid kann neben den beiden Einzelmodulen und den Aminosäuren, die zwischen den Einzelmodulen liegen, noch weitere Aminosäuren enthalten, die sich an einer Seite an mindestens eines der Einzelmodule anschließen. Die Gesamtlänge des erfindungsgemäßen isolierten Peptids beträgt vorzugsweise mindestens 6 Aminosäuren, mehr
15 bevorzugt mindestens 20 Aminosäuren und kann bevorzugt bis zu 500 Aminosäuren, mehr bevorzugt bis zu 100 Aminosäuren und am meisten bevorzugt bis zu 56 Aminosäuren und insbesondere bis zu 40 Aminosäuren betragen.
- 20 Wenigstens eines der zwei Einzelmodule, welche eine Bindung an Streptavidin vermitteln, wird bevorzugt ausgewählt aus einer der Sequenzen: -His-Pro-Gln-, -His-Pro-Gln-Phe-, -Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-, wobei Oaa entweder Trp, Lys oder Arg darstellt, Xaa eine beliebige Aminosäure und bevorzugt eine natürlich vorkommende Aminosäure
25 darstellt und wobei Yaa und Zaa entweder beide Gly darstellen oder Yaa Glu und Zaa Lys oder Arg darstellt,
-Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa, wobei Xaa eine beliebige Aminosäure darstellt und wobei Yaa und Zaa entweder beide Gly darstellen oder Yaa Glu und Zaa Lys oder Arg darstellt oder
30 -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys.

Die bevorzugten, sequenziell angeordneten Bindemodule verleihen eine erhöhte Affinität zu Streptavidin, können jedoch im kompetitiven Testformat noch ausreichend losgelöst werden.

- 5 Besonders bevorzugt weist das erfindungsgemäße Peptid die Sequenz Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa)_n-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys auf, wobei Xaa eine beliebige Aminosäure darstellt und n eine ganze Zahl von 5 bis 20, insbesondere von 8 bis 12 ist, sowie die Sequenz Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)_n-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys, wobei n
10 eine ganze Zahl von 1 bis 5 und bevorzugt 2 oder 3 darstellt.

- Im Rahmen der Erfindung wurde festgestellt, dass die erfindungsgemäßen Peptidsequenzen eine hohe Bindungsaffinität für Streptavidin bzw. Kern-Streptavidin (ein proteolytisches Spaltprodukt von Streptavidin) (Bayer,
15 E.A. et al., Biochem. J. 259 (1989), 369-376) sowie für Streptavidinm muteine aufweisen, die insbesondere höher als die Bindungsaffinitäten der einzelnen Bindungsmodule ist und gleichzeitig bei kompetitiven Bedingungen leicht eluiert werden können.

- 20 Die einzelnen Bindungsmodule des erfindungsgemäßen Peptids weisen bevorzugt eine Bindeaffinität zum jeweiligen Streptavidin-Rezeptor K_d von höchstens 10^{-2} , mehr bevorzugt höchstens 10^{-3} , noch mehr bevorzugt höchstens 10^{-5} und mindestens 10^{-13} , mehr bevorzugt mindestens 10^{-10} , noch mehr bevorzugt mindestens 10^{-8} und am meisten bevorzugt
25 mindestens 10^{-6} M auf. Die Elution unter kompetitiven Bedingungen wird dann bevorzugt mit einem Kompetitor durchgeführt, der eine höhere Affinität zum jeweiligen Streptavidinrezeptor aufweist, bevorzugt eine Affinität, welche mindestens eine Größenordnung, mehr bevorzugt mindestens zwei Größenordnungen und am meisten bevorzugt mindestens
30 3 Größenordnungen größer ist. Die Bindungsaffinität von Streptavidin:Biotin beträgt beispielsweise 4×10^{-14} M. Aufgrund der sequenziellen Anordnung der erfindungsgemäßen Dtags und des damit verbundenen

Aviditätseffektes ist insbesondere die Verwendung von 2 Bindemodulen, die jeweils eine Bindeaffinität von 10^{-6} M oder höher, insbesondere 10^{-5} M oder höher aufweisen möglich, wobei unter nicht kompetitiven Bedingungen trotz der geringen Bindeaffinitäten der einzelnen Bindemodule eine starke Bindung zum Streptavidin-Rezeptor erhalten wird.

Besonders bevorzugte Streptavidinmuteine sind solche, die im U.S. Patent 6,103,493 sowie in DE 196 41 876.3 beschrieben sind. Diese Streptavidinmuteine weisen innerhalb des Bereichs der Aminosäurepositionen 44 bis 53, bezogen auf die Aminosäuresequenz von Wildtyp-Streptavidin, mindestens eine Mutation auf. Bevorzugt sind Muteine eines Minimal-Streptavidins, welche N-terminal im Bereich der Aminosäuren 10 bis 16 von Wildtyp-Streptavidin beginnen und C-terminal im Bereich der Aminosäuren 133 bis 142 von Wildtyp-Streptavidin enden. Beispiele für solche Streptavidinmuteine weisen an Position 44 anstelle von Glu eine hydrophobe aliphatische Aminosäure auf, an Position 45 eine beliebige Aminosäure auf, an Position 46 eine hydrophobe aliphatische Aminosäure auf oder/und an Position 47 anstelle von Val eine basische Aminosäure auf. Besonders bevorzugt sind Streptavidinmuteine mit der Sequenz Ile-Gly-Ala-Arg oder Val-Thr-Ala-Arg an den Aminosäurepositionen 44 bis 47.



Seq 11
Seq 12

Das erfindungsgemäße isolierte Peptid wird bevorzugt als Tag oder Affinitätsanhängsel eingesetzt. Deshalb ist ein weiterer Gegenstand der Erfindung ein Fusionsprotein, umfassend ein wie oben beschriebenes erfindungsgemäßes Peptid mit mindestens zwei an Streptavidin oder Streptavidinmuteine bindenden Einzelmodulen verbunden mit einem Protein. Wenn die erfindungsgemäße Peptidsequenz in einem Fusionsprotein vorhanden ist, so weist auch dieses Fusionsprotein eine hohe Affinität für Streptavidin auf und kann gleichzeitig unter kompetitiven Bedingungen leicht eluiert werden.

Neben einer Elution bei kompetitiven Bedingungen, also in Gegenwart eines weiteren Streptavidinliganden, kann die Rezeptor-Affinitätsanhängsel-Bindung auch durch Veränderung des pH-Wertes (pH-Shift) gelöst werden, wodurch eine einfache Elution erfolgen kann. Bei Einstellen von sauren Bedingungen wird mindestens ein Histidinrest des erfindungsgemäßen Peptids protoniert, wodurch die Rezeptor-Affinitätsanhängsel-Bindung gelöst wird.

Die erfindungsgemäße Peptidsequenz kann am carboxyterminalen Ende, am aminoterminalen Ende oder innerhalb der Aminosäuresequenz des Proteins liegen, solange hiermit keine negativen Eigenschaften verbunden sind, wie z.B. eine Hinderung oder Zerstörung der biologischen Aktivität, wenn deren Erhaltung erwünscht ist.

Das im Fusionsprotein vorhandene Protein kann sowohl ein vollständiges Protein sowie eine Mutante eines Proteins, wie z.B. eine Deletionsmutante oder Substitutionsmutante, sein oder auch nur ein Teil eines Proteins. Das erfindungsgemäße Peptid kann direkt oder über Linker- oder Spacersequenzen mit dem gewünschten Protein verbunden sein.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Expressionsvektor, der eine Nukleinsäure-Sequenz, insbesondere eine DNA-Sequenz enthält, welche für ein erfindungsgemäßes Peptid codiert, sowie eine oder mehrere Restriktionsschnittstellen in 5'- oder/und 3'-Richtung von dieser Nukleinsäuresequenz aufweist, welche die Einbringung einer weiteren Nukleinsäuresequenz, insbesondere einer DNA-Sequenz erlaubt, die für das zu exprimierende Protein oder einen Proteinteil codiert. Die Nukleinsäuresequenz ist bevorzugt unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors und gegebenenfalls eines Operators. Bevorzugt schließt sich wenigstens eine Restriktionsschnittstelle unmittelbar an die für das erfindungsgemäße Peptid codierende Nukleinsäuresequenz an. Es ist aber auch möglich, die Schnittstellen in einiger Entfernung vorzusehen, so dass

zwischen dem erfindungsgemäßen Peptid und dem damit zu fusionierenden Protein ein Spacer- bzw. Linkerbereich bereitgestellt wird. Der Linkerbereich kann auch eine Spaltstelle für eine sequenzspezifische Protease, wie z.B. Enterokinase oder Faktor *Xa*, umfassen oder darstellen, so dass das

5 Affinitätsanhängsel nach Expression und ggf. Reinigung des Fusionsproteins von dem gewünschten Protein abgespalten werden kann.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Expressionsvektors wird es ermöglicht, die Nukleinsäuresequenz für ein interessierendes Protein in einfacher Weise

10 mit einer Nukleinsäuresequenz für das erfindungsgemäße Peptid anzuordnen und nach Expression ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein zu erhalten. Wird z.B. in eine Restriktionsschnittstelle in 5'-Richtung von der Nukleinsäuresequenz für das erfindungsgemäße Peptid die Nukleinsäuresequenz für das damit zu fusionierende Protein inseriert, wird

15 ein Fusionsprotein erhalten, welches das die Streptavidin-Affinität vermittelnde erfindungsgemäße Ditag- oder Multitag-Peptid am Carboxy-Terminus aufweist. Entsprechend liegt das erfindungsgemäße Affinitätsanhängsel am Aminoterminus vor, wenn die Nukleinsäuresequenz des zu fusionierenden Peptids in eine Restriktionsschnittstelle in 3'-

20 Richtung inseriert wird.

Die Restriktionsschnittstelle muss im erfindungsgemäßen Expressionsvektor nicht unbedingt unmittelbar neben der ersten oder letzten Base der für das Peptid codierenden Nukleinsäuresequenz liegen. Vorzugsweise sollte sie

25 jedoch so liegen, dass bei der Translation das Leseraster nicht beeinträchtigt wird und eine Verbindung von nur wenigen, vorzugsweise höchstens 10 zusätzlichen Aminosäuren zwischen dem Peptid und der Aminosäuresequenz des Proteins entsteht.

30 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Fusionsproteins, bei dem man eine für das oben genannte Fusionsprotein codierende Nukleinsäuresequenz in eine geeignete

Wirtszelle einbringt. Die Herstellung kann auch als in vitro Expression durchgeführt werden, wobei man eine für das Fusionsprotein codierende Nukleinsäuresequenz in einen Zellextrakt oder ein Zelllysat einbringt. Durch Expression der Nukleinsäuresequenz kann das erfindungsgemäße Fusionsprotein erhalten werden. Die Anwesenheit des Expressionsproduktes kann über ein Konjugat von Streptavidin oder einer Streptavidinmutante und einer Markierung oder/und einer Festphase leicht nachgewiesen werden. Weiterhin ist die Isolierung bzw. Aufreinigung des gewünschten Proteins als Fusionsprotein unter Verwendung der Streptavidin-bindenden Eigenschaften des erfindungsgemäßen Ditags oder Multitags auf einfache Weise möglich, wobei beispielsweise eine Streptavidin-Affinitäts-Chromatographie eingesetzt werden kann.

Das Einbringen der Nukleinsäuresequenz in eine geeignete Wirtszelle oder in Zelllysat erfolgt bevorzugt mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor, welcher eine Nukleinsäure enthält, die für das gewünschte Fusionsprotein codiert.

Das Konjugat aus Streptavidin und Markierung umfasst bevorzugt eine Fluoreszenzmarkierung oder/und eine Enzymmarkierung, insbesondere alkalische Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase. Grundsätzlich kann jedoch jede beliebige Markierung eingesetzt werden, die einen Nachweis erlaubt, beispielsweise auch Direktmarkierungen, wie etwa Gold- oder Latexpartikel, oder andere dem Fachmann bekannte Markierungen.

Ein wesentlicher Vorteil der erfindungsgemäßen Peptide und des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung von rekombinanten Fusionsproteinen liegt darin, dass die Aufreinigung des exprimierten Fusionsproteins leicht durch Affinitätschromatographie über eine Säule mit immobilisiertem Streptavidin oder eine immobilisierte Streptavidinmutante oder im Batch-Verfahren durchgeführt werden kann. Während die erfindungsgemäßen Ditags oder Multitags eine hohe Affinität zu dem

Rezeptor zeigen, kann die Elution trotzdem vorteilhaft unter sehr milden kompetitiven Bedingungen durchgeführt werden, z.B. durch Zugabe von Biotin oder Biotin-ähnlichen Verbindungen, und insbesondere durch Zugabe von 2-Iminobiotin, Liponsäure, Hydroxyphenylazobenzoessäure (HABA),
5 Dimethylhydroxyphenylazobenzoessäure (DM-HABA), Diaminobiotin oder/und Desthiobiotin. Durch eine kompetitive Elution mit Streptavidin-Liganden kann das gewünschte Fusionsprotein somit auf einfache Weise und unter schonenden Bedingungen wieder freigesetzt werden. Besonders bevorzugt ist die Elution im Kleinstmaßstab (von Microgrammmengen) im Batchformat mit Biotin.

Aufgrund der sehr starken Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin ist bei der Verwendung von Biotin als Kompetitor die Elution besonders effizient. Allerdings kann eine Regenerierung des Streptavidin-
15 Rezeptors bei Verwendung von Biotin als Kompetitor nicht oder nur schwierig erfolgen. Deshalb ist die Verwendung von Biotin insbesondere dann bevorzugt, wenn eine Regenerierung nicht notwendig ist, beispielsweise bei kleinen Maßstäben (Microgrammmengen Streptavidin).

Bei Durchführung der Elution in größerem, auch industriellem Maßstab (mg-
20 bis kg-Mengen Streptavidin) wird hingegen vorzugsweise ein Kompetitor verwendet, welcher eine ausreichend hohe Bindungsaffinität zum Streptavidin-Rezeptor hat, um eine effektive Elution zu bewirken, welcher aber trotzdem von dem Streptavidin-Rezeptor wieder losgelöst werden
25 kann, um ein regenerierbares System bereitzustellen. Besonders bevorzugt wird im großen Maßstab deshalb Desthiobiotin, Iminobiotin, Diaminobiotin, Liponsäure, HABA, oder/und DM-HABA als Kompetitor eingesetzt. Im großen Maßstab ist auch die pH-Erniedrigung eine interessante Alternative zur Kompetitionselektion.

30 Für die Streptavidin-Affinitäts-Chromatographie kann z.B. eine Streptavidin-Agarose-Matrix eingesetzt werden. Bevorzugt wird Sepharose

Polysaccharid (Pharmacia) oder Macro Prep (Poly-Methacrylat; Bio Rad) oder POROS (Polystyrol (OH-modifiziert); PE Biosystems) als Trägermaterial verwendet.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes Ditag- oder Multitagpeptid codiert.

- 10 Weiterhin umfasst die Erfindung die Verwendung von Streptavidin oder/und eines Streptavidinmuteins als Rezeptor zur Bindung eines erfindungsgemäßen Peptids.

- 15 Mit dem erfindungsgemäßen Ditag oder Multitag ist ein schneller und sicherer Nachweis von Fusionsproteinen, die beispielsweise als Expressionsprodukte erhalten werden, möglich. Weiterhin weist das Fusionsprotein genau einstellbare und vorteilhafte Bindungseigenschaften an Streptavidin auf, sodass eine leichte Aufreinigung des Expressionsproduktes ermöglicht wird, die auch in großtechnischem Maßstab durchführbar ist.

- 20 Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Expressionsvektors wird die Expression eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins erleichtert, wobei ein solcher Expressionsvektor universell für alle zu exprimierenden Proteine anwendbar ist. Das erfindungsgemäße Peptid stört im Fusionsprotein die biologische Aktivität des übrigen Proteinanteils nicht und muss daher nicht unbedingt vor einer Weiterverwendung abgespalten werden. Sollte jedoch aus bestimmten Gründen eine Abspaltung erwünscht sein, so kann der erfindungsgemäße Expressionsvektor auch derart aufgebaut sein, dass er zwischen der Restriktionsschnittstelle zur Einbringung der Nukleinsäuresequenz für das Protein und der für das Protein codierenden
- 25 Sequenz noch eine Nukleinsäuresequenz aufweist, welche für eine spezifische Proteaseschnittstelle codiert. Somit kann nach Expression und
- 30

gegebenenfalls Aufreinigung oder Nachweis des Expressionsproduktes eine leichte Abspaltung der Peptidsequenz durchgeführt werden.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und die beigefügte Figur
5 weiter erläutert.

Figur 1 zeigt die Bindung von Cytochrom b562, rot, mit verschiedenen
Affinitätsanhängseln an Strep-Tactin-Sepharose, wobei auf die mit "L"
bezeichneten Säulen Cytochrom b562-Di-tag 3, auf die mit "M"
10 bezeichneten Säulen Cytochrom b562-Di-tag 2 und auf die mit "R"
bezeichneten Säulen Cytochrom b562-Mono-tag aufgebracht worden ist.

Figur 1.1 zeigt das Bindeverhalten der Fusionsproteine bei Elution mit 2 ml
eines nicht kompetitiven Puffers. Wie in Figur 1.1 zu sehen ist, wird das
15 Mono-tag-Fusionsprotein bereits unter nichtkompetitiven Bedingungen von
der Säule ausgewaschen, d.h. die Bande wandert nach unten, während die
beiden Di-tag-Fusionsproteine stabil im oberen Bereich der Säule
immobilisiert bleiben.

Figur 1.2 zeigt das Bindeverhalten der Fusionsproteine bei Elution mit 12 ml
eines nicht kompetitiven Puffers. Während auch hier die beiden Di-tag
Varianten stabil im oberen Bereich der Säule immobilisiert bleiben, ist die
Bande des Mono-tag-Fusionsproteins schon sehr weit auseinander gezogen
und durch das Gel gewandert.

Figur 1.3 zeigt das Bindeverhalten der Fusionsproteine bei Elution mit
0,5 ml eines kompetitiven Puffers, welcher Desthiobiotin enthält.

Figur 1.4 zeigt das Bindeverhalten der Fusionsproteine bei Elution mit
30 1,5 ml eines kompetitiven Puffers, welches Desthiobiotin enthält.

Wie aus den Figuren 1.3 und 1.4 zu ersehen ist, ist die kompetitive Verdrängungsgeschwindigkeit für alle Fusionsproteine nahezu identisch, was bedeutet, dass die beiden Di-tag-Fusionsproteine genauso effizient von der Säule unter kompetitiven Bedingungen verdrängt werden, wie das Mono-tag-Fusionsprotein.

Beispiele

Beispiel 1

10

Es wurden drei verschiedene rekombinante Proteine mit einem Monotag der Sequenz Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys, einem Ditag 1 der Sequenz Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys und einem Ditag 2 mit der Sequenz Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys hergestellt, so dass insgesamt 9 verschiedene rekombinante Fusionsproteine erhalten wurden.

15

Für dieses Experiment wurden zwei gefärbte Proteine (Green Fluorescent Protein (GFP) aus *A. victoria*, grün, und Cytochrom b 562 aus *E. coli*, rot) und ein Enzym (alkalische Phosphatase aus *E. coli*) verwendet, um die Anwesenheit des Fusionsproteins jeweils ohne Weiteres direkt oder nach Zugabe eines chromogenen Enzymsubstrats anhand der Farbe beobachten zu können.

20

Die Bindungseigenschaften aller 9 Proteine wurden in einem Biacore-Gerät kinetisch untersucht, wobei als Rezeptor Streptavidin (Wildtyp mit der Sequenz Glu-Ser-Ala-Val an den Positionen 44 bis 47), Streptavidinmucin m1 (mit der Sequenz Val-Thr-Ala-Arg an den Positionen 44 bis 47) und Streptavidinmucin m2 (mit der Sequenz Ile-Gly-Ala-Arg an den Positionen 44 bis 47) eingesetzt wurden.

25
30

Zur Dissoziationskinetikbestimmung wurde einmal mit Kompetitor (z.B. Desthiobiotin) und einmal ohne Kompetitor gemessen.

5 Der Verbleib der alkalischen Phosphatase (AP) in einer Mikrotiterplatte kann leicht durch die Färbung mit einem Enzymsubstrat indirekt nachgewiesen werden. Es wurde festgestellt, dass mit Ditags versehene AP eine deutlich stärkere Anbindung an mit Strep-Tactin beschichtete Wände von Mikrotiterplatten als die mit einem Monotag versehene AP zeigt.

10 Beispiel 2

Anhand von magnetischen, mit Strep-Tactin beschichteten Beads wurde eine Reinigung von Fusionsproteinen mit Ditags im Batch-Format in verschiedenen Verdünnungsstufen durchgeführt. Es gelang eine Reinigung
15 der Fusionsproteine in kleinem Maßstab mit hoher Ausbeute und hohem Reinheitsgrad.

Beispiel 3

20 Bindung von Cytochrom b562 mit verschiedenen Affinitätsanhängseln an Strep-Tactin Sepharose

Von E.coli Cytochrom b562, rot, mit C-terminalem Strep-tag ist bekannt, dass es im Vergleich zu anderen Strep-tag Fusionsproteinen besonders
25 schlecht an immobilisiertes Streptavidin bindet (Schmidt und Skerra, 1994).

In diesem Experiment wurden die Bindung von Cytochrom b562 - mit verschiedenen Affinitätsanhängseln am C-Terminus (Di-tag 3; Di-tag 2; Mono-tag) - an 3 Säulen (L,M,R) mit identischem Strep-Tactin-Sepharosematerial verglichen:
30

- L (Di-tag 3): Cytochrom b562-WSHPQFEKGGGSGGGSGGGWSHPQFEK-COOH 5.9.
- M (Di-tag 2): Cytochrom b562-WSHPQFEKGGGSGGGSGGGWSHPQFEK-COOH 5.9
- 5 R (Mono-tag): Cytochrom b562-WSHPQFEK-COOH 5.0
- (Die unterstrichenen Bereiche sind die streptavidinbindenden Module)

Definierte gereinigte Mengen der 3 unterschiedlichen Fusionsproteine (700 μg mit Di-tag 3; 800 μg mit Di-tag 2; 950 μg mit Mono-tag) wurden auf eine Strep-Tactin Sepharose-Säule mit 2 ml Bettvolumen und einer Biotin-Bindungskapazität von ca. 350 nmol pro ml gegeben. Nachdem die Proteinlösung vollkommen eingedrungen war, wurde die Säule mit Puffer W (100 mM Tris-Cl pH 8,0; 150 mM NaCl; nicht kompetitive Bedingungen) gewaschen. Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen den Verbleib des Fusionsproteins nach 2 ml bzw. 12 ml Puffer W. Man kann deutlich erkennen, dass das Cytochrom b562-Mono-tag Fusionsprotein bereits unter nicht kompetitiven Bedingungen von der Säule ausgewaschen wird und im oberen Bereich bereits vollständig entfernt wurde, während die beiden Di-tag-Varianten vergleichsweise stabil im oberen Bereich der Säule immobilisiert bleiben. Dieser Befund lässt den unmittelbaren Schluss zu, dass signifikant größere Mengen an Cytochrom b562-di-tag-Fusionsprotein an gleichen Mengen identischen Säulenmaterials gereinigt werden können. Nach dem Waschen mit 12 ml Puffer W wurde die Säule mit Puffer E (100 mM Tris-Cl pH 8,0; 150 mM NaCl; 2,5 mM Desthiobiotin; kompetitive Bedingungen) behandelt. Abbildung 3 und 4 zeigen den Verbleib des Fusionsproteins nach 0,5 bzw. 1,5 ml Puffer E. Die kompetitive Verdrängungsgeschwindigkeit ist für alle Varianten nahezu identisch. Das bedeutet, dass die beiden Di-tag-Fusionsproteine genauso effizient in diesem Chromatographieexperiment von der Strep-Tactin-Sepharose-Säule unter kompetitiven Bedingungen verdrängt werden wie das Mono-tag-Fusionsprotein.

LITERATUR

Devlin, J.J., Panganiban, L.C. & Devlin, P.E. (1990), Random peptide libraries: A source of specific protein binding molecules. Science 249, 404-406.

Lam, K.S., Salmon, E.S., Hersh, E.M., Hruby, V.J., Kazmierski, W.M. & Knapp, R.J. (1991). A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. Nature 354, 82-84.

Schmidt, T.G.M. & Skerra, A. (1993). The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig F_v fragment. Prot. Engineering 6, 109-122.

Schmidt, T.G.M. & Skerra, A. (1994). One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. J. Chromatogr. A 676, 337-345.

Schmidt, T.G.M., Koepke, J., Frank, R. & Skerra, A. (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. J. Mol. Biol. 255, 753-766.

Skerra, A. & Schmidt, T.G.M. (1999). Applications of a Peptide Ligand for streptavidin: the Strep-tag. Biomolecular Engineering 16, 79-86.

Voss, S. & Skerra, a. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. Protein Eng. 10, 975-982.

Weber, P.C., Pantoliano, M. W. & Thompson, L.D. (1992). Crystal structure and ligand-binding studies of a screened peptide complexed with streptavidin. *Biochemistry* 31, 9350-9354.

5 Weber, P.C., M.W. Pantoliano and F.R. Salemme (1995). Crystallographic and thermodynamic comparison of structurally diverse molecules binding to streptavidin. *Acta Cryst. D51*: 590-596.

Ansprüche

1. Isoliertes Peptid, umfassend mindestens zwei Einzelmodule, wobei der Abstand zwischen den zwei Einzelmodulen mindestens 0 und maximal 50 Aminosäuren beträgt und wobei jedes Einzelmodul mindestens die Sequenz -His-Pro-Baa- beinhaltet, worin Baa entweder Glutamin, Asparagin oder Methionin darstellt.
2. Isoliertes Peptid nach Anspruch 1, wobei mindestens ein Einzelmodul mindestens die Sequenz -His-Pro-Gln- beinhaltet.
3. Isoliertes Peptid nach Anspruch 1 oder 2, wobei mindestens ein Einzelmodul mindestens die Sequenz -His-Pro-Gln-Phe- beinhaltet.
4. Isoliertes Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei mindestens ein Einzelmodul mindestens die Sequenz -Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa- beinhaltet, wobei Oaa entweder Trp, Lys oder Arg darstellt, Xaa eine beliebige Aminosäure darstellt und wobei Yaa und Zaa entweder beide Gly darstellen oder Yaa Glu und Zaa Lys oder Arg darstellt.
5. Isoliertes Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei mindestens ein Einzelmodul mindestens die Sequenz -Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa- beinhaltet, wobei Xaa eine beliebige Aminosäure darstellt und wobei Yaa und Zaa entweder beide Gly darstellen oder Yaa Glu und Zaa Lys oder Arg darstellt.
6. Isoliertes Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei mindestens ein Einzelmodul mindestens die Sequenz -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys- beinhaltet.

7. Isoliertes Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6, welches die Sequenz $\text{Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa)}_n\text{-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys}$ beinhaltet, wobei Xaa eine beliebige Aminosäure darstellt und n entweder 8 oder 12 darstellt.
8. Isoliertes Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 7, welches die Sequenz $\text{Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)}_n\text{-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys}$ beinhaltet, wobei n entweder 2 oder 3 darstellt.
9. Fusionsprotein, umfassend ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 8 verbunden mit einem Protein.
10. Fusionsprotein nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem vollständigen Protein, einer Proteinmutante, insbesondere einer Deletions- oder Substitutions-Mutante oder einem Proteinteil.
11. Expressionsvektor, umfassend eine Nukleinsäure-Sequenz, welche für ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 8 codiert sowie eine Restriktionsschnittstelle in 5'- oder/und 3'-Richtung anschließend an diese Nukleinsäuresequenz, welche die Einbringung einer weiteren Nukleinsäuresequenz erlaubt, die für ein zu exprimierendes Protein oder einen Proteinteil codiert.
12. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Fusionsproteins, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Nukleinsäuresequenz, welche für ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 9 oder 10 codiert, in eine geeignete Wirtszelle oder in ein Zelllysate oder in einen Zellextrakt einbringt.

13. Verfahren nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass man die geeignete Wirtszelle mit einem Vektor transfiziert,
welcher eine Nukleinsäure enthält, die für ein Fusionsprotein nach
einem der Ansprüche 9 oder 10 codiert.
14. Verfahren zum Nachweis oder/und zur Gewinnung des
Fusionsproteins nach Anspruch 9 oder 10 in bzw. aus einer Probe,
umfassend das Inkontaktbringen der Probe mit einem Konjugat von
Streptavidin und einer Markierung oder/und mit einem Konjugat von
Streptavidin und eines Trägermaterials.
15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine Fluoreszenzmarkierung oder/und eine
Enzymmarkierung, insbesondere alkalische Phosphatase oder
Meerrettich-Peroxidase verwendet.
16. Verfahren nach Anspruch 14 zur Isolierung eines an ein Peptid nach
einem der Ansprüche 1 bis 8 gebundenen Proteins aus einer Probe
umfassend das Unterziehen der Probe einer Streptavidinaffinitäts-
chromatographie zur Bildung eines Komplexes zwischen dem Peptid
und Streptavidin oder/und einem Streptavidinmucin und Eluieren des
Proteins durch Inkontaktbringen des Komplexes mit einem
Streptavidin- oder/und Streptavidinmucinliganden und Isolieren des
Proteins aus der Probe.
17. Verfahren nach Anspruch 16, worin der als Kompetitor eingesetzte
Streptavidinligand die Aminosäuresequenz Trp-X-His-Pro-Gln-Phe-Y-Z
umfasst, worin X einen beliebigen Aminosäurerest darstellt und Y
und Z jeweils Gly darstellen oder worin Y Glu darstellt und Z Arg
oder Lys darstellt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet,
dass man als Streptavidinligand zur Eluierung des Fusionsproteins
Biotin oder ein Derivat davon, insbesondere 2-Iminobiotin,
Liponsäure, Hydroxyphenylazobenzoessäure, Dimethylhydroxy-
phenylazobenzoessäure Diaminobiotin oder/und Desthiobiotin
einsetzt.
19. Nukleinsäure, codierend für ein Peptid nach einem der Ansprüche 1
bis 8.
20. Verwendung von Streptavidin oder/und eines Streptavidinmuteins als
Rezeptor zur Bindung eines Peptids nach einem der Ansprüche 1 bis
8.

Figur 1

